

19



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

11

Veröffentlichungsnummer:

**0 180 920
A2**

12

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 85113857.8

51

Int. Cl.: **C 07 K 1/00**

C 07 K 3/00, C 07 K 15/00

22 Anmeldetag: 31.10.85

30

Priorität: 09.11.84 DE 3440988

43

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
14.05.86 Patentblatt 86/20

84

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

71

Anmelder: **HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT**
Postfach 80 03 20
D-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

72

Erfinder: **Bicker, Richard, Dr.**
Brunnenstrasse 40
D-6237 Liederbach(DE)

72

Erfinder: **Seipke, Gerhard, Dr.**
Brunnenweg 4
D-6200 Wiesbaden(DE)

54

Verfahren zur Spaltung von Peptiden und Proteinen an der Methionyl-Bindung.

57

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Spaltung von Peptiden und Proteinen an der Methionyl-Bindung mit Hilfe von Chlorcyan.

EP 0 180 920 A2

Verfahren zur Spaltung von Peptiden und Proteinen an der Methionyl-Bindung

Im Rahmen gentechnologischer Gewinnung von Peptiden und Proteinen (z.B. Insulin, Proinsulin, Preproinsulin und dessen Analoga, Interferon, Wachstumshormon) hat es sich oftmals als vorteilhaft erwiesen, die Produkte zunächst in der Form höhermolekularer "Fusionsproteine" zu isolieren.

Die so anfallenden Fusionsproteine sind stabiler als die gewünschten Produkte und können unter Ausnutzung von Induktionssystemen in höheren Ausbeuten isoliert werden. Für derartige Fusionen kommen im Prinzip alle in größeren Mengen von den Wirtsorganismen synthetisierten Proteine in Frage, vor allem wenn deren Synthese gut induzierbar ist; häufiger beschrieben sind die β -Galactosidase, β -Lactamase, Teile des Cro-Proteins, des C_{II} -Proteins und der Enzyme des Tryptophan-Stoffwechsels (vor allem Trp D, Trp E). Dabei erfreuen sich Fusionen des gewünschten Genprodukts mit β -Galaktosidase besonderer Beliebtheit, weil die dabei zunächst anfallenden Proteine häufig schwerlöslich und somit gut anzureichern sind (A.V. Fowler und I. Zabin, J. Biol. Chem. 258 (1983) 14354-58).

Aus den resultierenden Fusionsproteinen können die gewünschten Produkte mit chemischen und enzymatischen Methoden abgespalten werden, wobei diese Spaltreaktionen hoch spezifisch sein müssen, um Schädigungen der Produkte zu vermeiden.

Chemische Methoden zur Proteinspaltung sind meist in Zusammenhang mit der Peptid-Sequenzanalytik von Proteinen referiert (siehe z.B. Handbook of Protein Sequence Analyses, 2nd Edition, L.R. Croft, John Wiley a. Sons; B. Wit-

kop, Advan. Prot. Chem. 16 (1961), 221 sowie E. Gross, Methods in Enzymology, Vol. XI, 238 (1967)).

5 Besonders häufig wird eine Spaltung an Methionyl-Bindungen mit Bromcyan referiert (B. Witkop, Adv. Prot. Chem. 16 (1961) 221), da hiermit im allgemeinen hohe Spaltausbeuten ohne Schädigung anderer Peptidbindungen oder Aminosäureseitenketten erzielt werden.

10 Um hohe Spaltausbeuten zu erzielen, werden üblicherweise hohe Bromcyanüberschüsse (bis 250fach; siehe B. Witkop-Artikel) bezogen auf die zu spaltenden Methionyl-Bindung eingesetzt, bei langen Reaktionszeiten bis 30 Stunden und Raumtemperatur. Die Reaktion wird in stark saurem Milieu
15 durchgeführt, ein bevorzugtes Lösungsmittel ist Ameisensäure im Konzentrationsbereich von 70-88 Volumen-%.

Bromcyan (BrCN) ist ein Feststoff (Schmp. 52°C, Kp. 62°C), eine hochtoxische Verbindung. Die tödliche Dosis für einen
20 normalen Menschen beträgt 92 ppm bei einer Einwirkzeit von 10 Minuten (Gmelin Syst. Nr. 14 C, Fl. D 3 1976, S. 217 - 241; Petty's Industrial Hygiene and Toxicology, 3. Auflage 1982, Bd. 2 c, S. 4861). Bei unsauberen Präparaten ist ein spontaner Zerknall von Packungen beschrieben (s. Broschüre
25 Sicherheit mit Merck, E. Merck, Darmstadt 5/13090/60/1282 R).

Die Handhabung großer Mengen BrCN bei der großtechnischen Proteinspaltung ist daher sehr problematisch, neben den Sicherheitsaspekten spielen auch technische Fragestellungen
30 (z.B. Förderung von Feststoffen) eine Rolle.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß sich die Methionyl-Bindung mit Chlorcyan (ClCN) spalten läßt.

35 Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Spaltung von

Peptiden und Proteinen an der Methionyl-Bindung, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man die Spaltung mit Chlorcyan durchführt.

- 5 Proteinspaltungen mit ClCN sind in der Literatur nicht beschrieben.

Für den Fachmann ist der Einsatz von ClCN zur nichtenzymatischen Proteinspaltung nicht unbedingt vorhersehbar, da
10 ClCN eine von BrCN deutlich unterschiedliche chemische Reaktivität zeigt (vgl. hierzu Houben-Weyl, Bd. II, S. 545; Ullmann Bd. 9, S. 668, B.S. Thyagarajan, The Chemistry of Cyanogen Halides 2, (1968); R.T. Parfitt, J. Chem. Soc. (C), 140, (1967)). Neben der unterschiedlichen Reaktivität
15 und Aktivität von BrCN und ClCN beobachtet man auch unterschiedliches Reaktionsverhalten gegenüber gleichen Reaktionspartnern.

ClCN ist bei Raumtemperatur ein Gas (Schmp. $-6,9^{\circ}\text{C}$; Sdp. $13,0^{\circ}\text{C}$); es ist nicht so toxisch wie BrCN (vgl. Gmelin
20 Syst. Nr. 14 C, F 1, D 3, 1976, S. 185; Petty's Industrial Hygiene and Toxicology, 3. Auflage 1982, Bd. 2 c, S. 4859). Die tödliche Dosis für einen Menschen beträgt 159 ppm bei einer Einwirkzeit von 10 Minuten (vgl. 92 ppm für BrCN). Da
25 der Reiz-Schwellenwert von ClCN mit $2,5 \text{ mg/m}^3$ deutlich niedriger liegt als der von BrCN ($6,0 \text{ mg/m}^3$), hat ClCN eine größere "Selbstwarnung". Es besitzt daher für einen technischen Einsatz erhebliche Sicherheitsvorteile.

- 30 Daneben bietet der Einsatz von ClCN auch erhebliche verfahrenstechnische Vorteile: ClCN ist als Gas einfacher und gefahrloser dosierbar und förderbar als der Feststoff BrCN.

Nach beendeter Reaktion kann der Chlorcyan-Überschuß durch
35 Einblasen eines geeigneten Gases aus dem Reaktionsgemisch

entfernt werden. Geeignet sind inerte Gase wie z.B. Stickstoff. Zur Unterdrückung der Schaumbildung können geeignete Entschäumer zugesetzt werden. Gut geeignet sind z.B. die Typen SE 3, 6 und 9 der Firma Wacker Chemie.

- 5 Im Anschluß daran wird das Reaktionsgemisch in üblicher Weise aufgearbeitet.

Der mit ClCN beladene Gasstrom kann durch einen Wäscher geleitet werden, der mit wäßriger NaOH- und/oder NaOCl-Lösung gefüllt ist. Dabei wird das ClCN zu NaCl und NaOCN abgebaut (s. Gmelin Syst. Nr. 14 C, F 1, D 3, 1976, S. 184; Petty's Industrial Hygiene and Toxicology, 3. Auflage 1982, Bd. 2 c, S. 4859).

- 15 Durch diese Verfahrensweise kann das Spaltreagenz (ClCN) wesentlich sicherer entsorgt werden als das toxischere BrCN. Die Entsorgung ist damit zeitlich und räumlich getrennt von der Proteinisolierung, die nach bekannten Methoden (Eindampfen, Gefriertrocknung) durchgeführt werden kann.

- 25 Chlorcyan wird vorteilhaft in einem 2 bis 30-fachen molaren Überschuß pro zu spaltende Methionyl-Bindung eingesetzt. Bevorzugt ist ein 5 bis 8-facher molarer Überschuß. Die Reaktionsdauer beträgt gewöhnlich 1-10 Stunden, vorzugsweise 3-6 Stunden.

- 30 Als Reaktionsmedium eignet sich ein Gemisch aus Wasser und einer Mineralsäure oder einer wassermischbaren organischen Säure. Bevorzugt sind organische Säuren, wie z.B. Ameisensäure. Der Gehalt von Ameisensäure im Reaktionsmedium kann 50-95 Volumen-%, vorzugsweise 65-88 Volumen-% betragen.

- 35 Die nachstehenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung, ohne daß diese darauf beschränkt wäre.

Beispiel 1 (Vergleichsbeispiel)

1 g β -Galactosidase aus E.coli (Gehalt ca. 70 %, Methionin-
gehalt 0,16 mMol/g bestimmt durch Aminosäureanalyse) werden
5 in 7,5 ml 70 Vol.-% HCOOH eingerührt und mit 0,135 g Brom-
cyan (= 1,28 mMol) versetzt.

Das Reaktionsgemisch wird 6 Stunden bei Raumtemperatur ge-
rührt, mit 100 ml H₂O verdünnt und gefriergetrocknet.

10 Der Rückstand beträgt 0,97 g Spaltproteingemisch.

In der Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist keine
 β -Galactosidase mehr zu erkennen. Man findet vorzugsweise
15 Proteinfragmente im Molekulargewichtsbereich von 5 000 -
20000 Dalton. Nach Aminosäureanalyse und gaschromato-
graphischer Methylrhodanidbestimmung beträgt die
Spaltungsrate 94 %.

20 Beispiel 2

1 g β -Galactosidase aus E.coli (Gehalt ca. 70 %, Methionin-
gehalt 0,16 mMol/g bestimmt durch Aminosäureanalyse) werden
in 7,5 ml 70 Vol.-% HCOOH eingerührt und mit 0,079 g ClCN
25 (= 1,28 mMol) versetzt.

Das Reaktionsgemisch wird 6 Stunden bei Raumtemperatur
gerührt.

30 Nach beendeter Reaktion werden 1-5 μ l Entschäumer (SE 9 der
Firma Wacker Chemie, Burghausen) zugesetzt und das über-
schüssige Chlorcyan durch Einblasen von N₂ (15 l/h) in ca.
1,5 Stunden entfernt. Der mit Chlorcyan beladene N₂-Strom
wird in eine mit Natronlauge gefüllte Waschflasche einge-
35 leitet.

- 6 -

Nach der ClCN-Austreibung wird die Lösung mit 100 ml H₂O verdünnt und gefriergetrocknet.

Der Rückstand beträgt 1 g.

- 5 In der SDS-PAGE ist keine β -Galactosidase mehr zu erkennen. Man findet vorzugsweise Proteinfragmente im Molekulargewichtsbereich von 5 000 - 20 000 Dalton. Nach Aminosäureanalyse und gaschromatographischer Methylrhodanidbestimmung beträgt die Spaltungsrate 93 %.

10

Beispiel 3

- 1 g β -Lactamase, isoliert aus E.coli-Zellen, die das Plasmid pBR 322 enthalten (Gehalt ca. 75 %, Methioningehalt 0,28 mMol/g) werden in 10 ml 70 Vol.-% HCOOH eingerührt und mit 0,236 g ClCN (= 2,28 mMol) versetzt.

15

Das Reaktionsgemisch wird 6 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

20

- Nach beendeter Reaktion werden 1-5 μ l Entschäumer (SE 9 der Firma Wacker Chemie, Burghausen) zugesetzt und das überchüssige Chlorcyan durch Einblasen von N₂ (15 l/h) in ca. 1,5 Stunden entfernt. Der mit Chlorcyan beladene N₂-Strom wird in eine mit Natronlauge gefüllte Waschflasche eingeleitet.

25

Nach der ClCN-Austreibung wird die Lösung mit 100 ml H₂O verdünnt und gefriergetrocknet.

30

Der Rückstand beträgt 0,99 g.

- In der SDS-PAGE ist keine β -Lactamase mehr zu erkennen. Man findet vor allem Proteinfragmente im Molekulargewichtsbereich 3 000 - 10 000 Dalton. Nach Aminosäureanalyse und gaschromatographischer Methylrhodanidbestimmung beträgt die Spaltungsrate 92 %.

35

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Spaltung von Peptiden und Proteinen an der Methionyl-Bindung, dadurch gekennzeichnet, daß man die Spaltung mit Chlorcyan durchführt.
- 5 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man nach beendeter Reaktion den Chlorcyan-Überschuß mit einem geeigneten Gas aus dem Reaktionsgemisch entfernt und das Reaktionsgemisch anschließend in üblicher Weise aufarbeitet.
- 10 3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man den Chlorcyan-Überschuß mit Stickstoff aus dem Reaktionsgemisch entfernt.
- 15 4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß man Chlorcyan in einem 2 bis 30-fachen molaren Überschuß pro zu spaltende Methionyl-Bindung einsetzt.
- 20 5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß man Chlorcyan in einem 5 bis 8-fachen molaren Überschuß pro zu spaltende Methionyl-Bindung einsetzt.
- 25 6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reaktion in 1-10 Stunden durchführt.
- 30 7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3-6, dadurch gekennzeichnet, daß man die Reaktion in 3-6 Stunden durchführt.

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 3-7, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reaktionsmedium ein Gemisch aus Wasser und einer wassermischbaren Säure verwendet.
- 5 9. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Reaktionsmedium ein Gemisch aus Wasser und Ameisensäure verwendet.
- 10 10. Verfahren gemäß Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Ameisensäure-Gehalt im Reaktionsmedium 50-95 Volumen-% beträgt.